

# Genová expresní analýza jako nástroj detekce rozvoje diabetu 1.typu

**PREDIA**

**Doc. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D.**  
*Laboratoř autoimunitních onemocnění*  
**Pediatrická klinika FN v Motole a**  
**2. lékařské fakulty University Karlovy**

# Počáteční stimul?

Vnější faktory



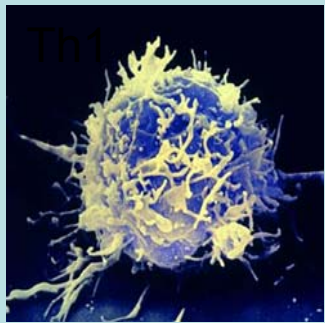
Vnitřní faktory (genetické pozadí)

Prediabetická fáze

Ab pozitivita

T1D Manifestace

čas



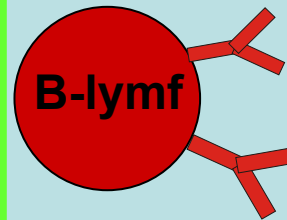
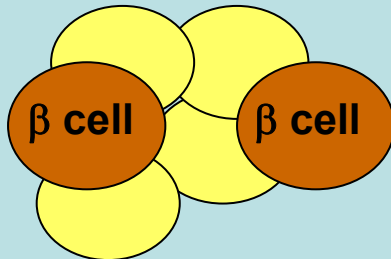
Th1

Cytokiny



Makrofágy, Tc

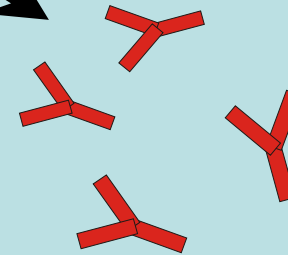
Cytokiny



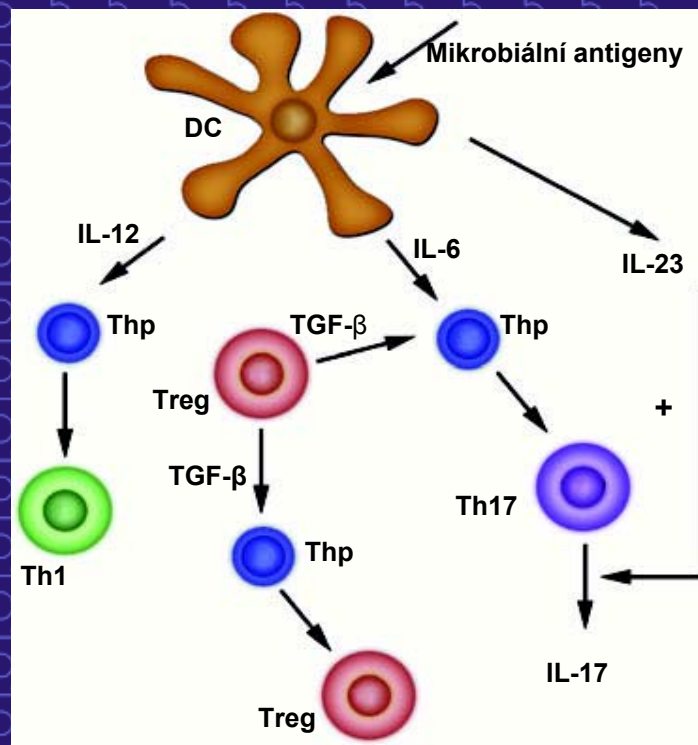
B-lymf



ICA, GAD65A, IAA, IA2A

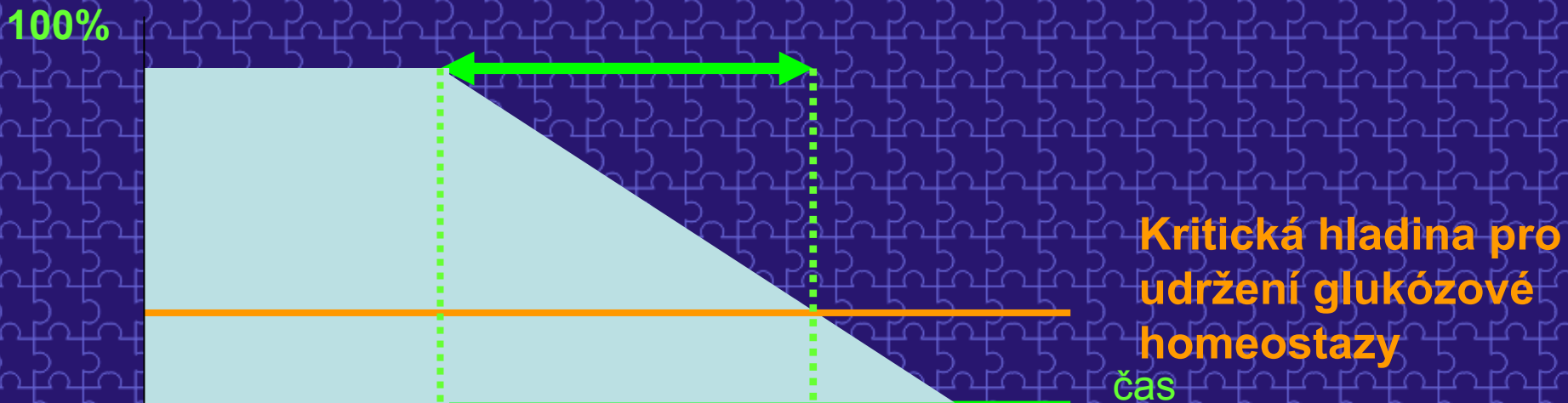


# Diferenciace Th buněk



# Proč je důležitá časná detekce autoimunitního procesu?

Množství beta buněk



Důležitost určení prediabetické fáze

# Prediabetes

Genetické pozadí  
HLA genotypizace

Autoprotilátky

GAD, IA2, IAA,  
ZnT8A

Rizikový cytokinový  
vzorec

???

Signalizační dráhy

TGFbeta/IL10

# Program predikce diabetu 1.typu

Určen pro prvostupňové příbuzné pacientů s T1D

Sourozenci diabetických dětí  
(n=670)

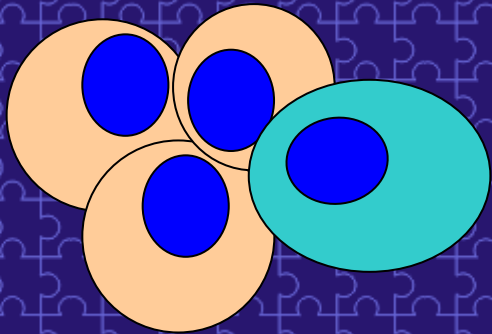
Děti diabetických rodičů  
(n=478)

# Program predikce diabetu 1. typu dnes

- HLA genotypizace
- Stanovení autoprotilátek  
(GADA, IAA, antilA2)

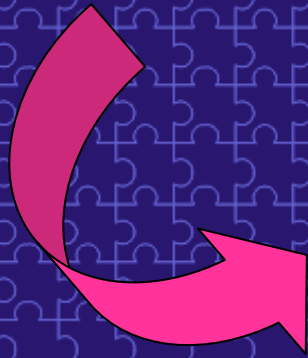
Protilátkově pozitivní pacienti →  
Funkční test - ivGTT  
Buněčné testy – cytokinový profil

PBMC



Basální stav

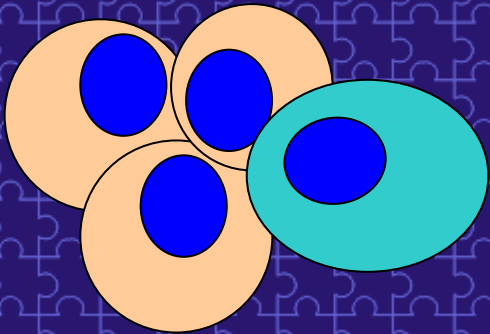
Stav po stimulaci



### Stimulace = + Autoantigeny (IDS):

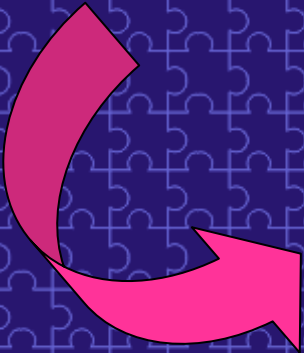
- GAD 65
- GAD 65 a.a. 247-279  
509-528  
524-543
- IA-2/R2 a.a.853-872
- Proinsulin, beta řetězec a.a.9-23
- PHA jako pozitivní kontrola, E.coli

PBMC



Basální stav

Stav po stimulaci



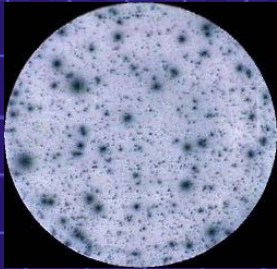
- 1) Na proteinové úrovni  
- Cytokinový profil-
- 2) Na genové úrovni  
- Genová exprese-

# „Proteinová array“ studovaná skupina n=220

	D (T1D pacienti)	DRL (příbuzní) AB +	DRL ABS -	DV
Studovaná skupina	60	40	60	60

# Cytokinový profil

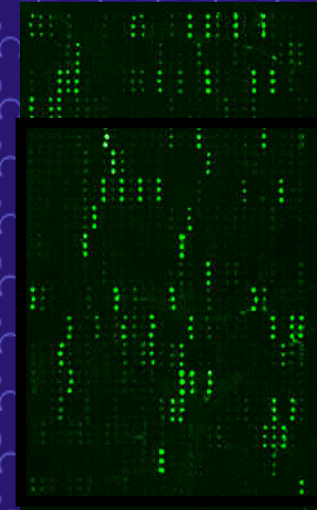
ELISPOT



Protein microarray



Quantibody



ELISA



# Protein array - výsledky

## Rizikový vzorec

Th1 cytokiny: TNF-beta, IFN-gamma

Th2 cytokiny: IL-13

Th3 cytokiny: IL-10, TGF-beta (p<0.01 pro oba)

„Zánětlivé cytokiny“: IL-6

Další (Th17, Th9): IL-9, -17

# „Genová array“ studovaná skupina n=76

	<b>D (T1D pacienti)</b>	<b>DRL (příbuzní) AB +</b>	<b>DRL ABS -</b>	<b>DV</b>
<b>Studovaná skupina</b>	<b>22</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>18</b>

# Genová array

- Phalanx array, 30968 genomových prób (NimbleGen), GeneSpring, MetaCore software, RT-PCR



PBMC

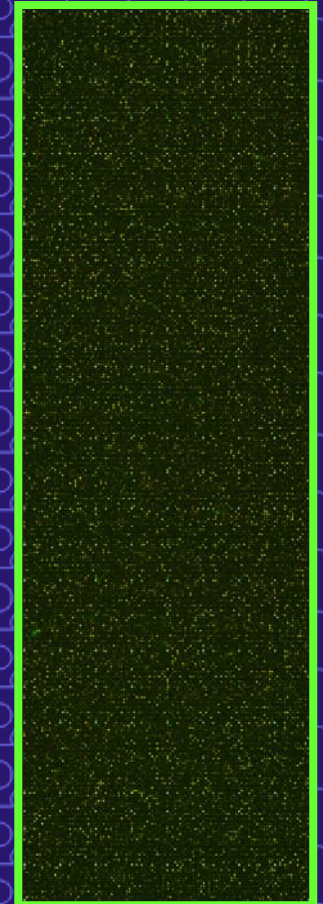
PBMC bez stimulace  
= **bazální stav**

PBMC + autoantigeny  
= **stav po stimulaci**

NA

hybridizace

??? Změna na úrovni genové exprese???



# Genomová data – „klastry“



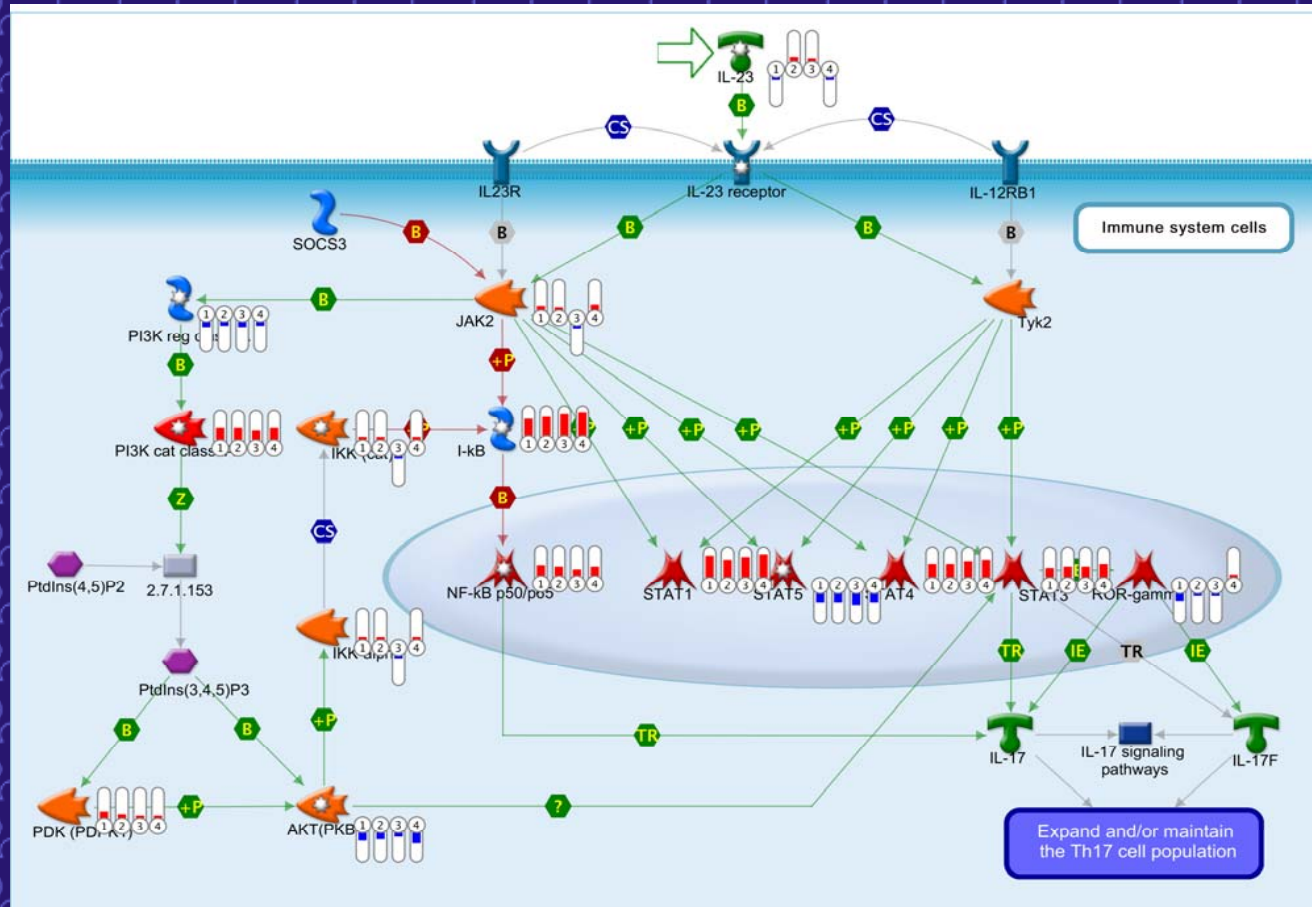
# Genová array výsledky a funkční genomika

Nejzajímavější data vyšla u Abs + příbuzných, kde byl nejsignifikantnější rozdíl ve srovnání s ostatními skupinami v imunologických drahách zapojených do

- Antivirové odpovědi
- TLR signalizace (TLR-1, -2,-3,-4)
- IL-9, -17, -23 a IL-27  
signální dráhy

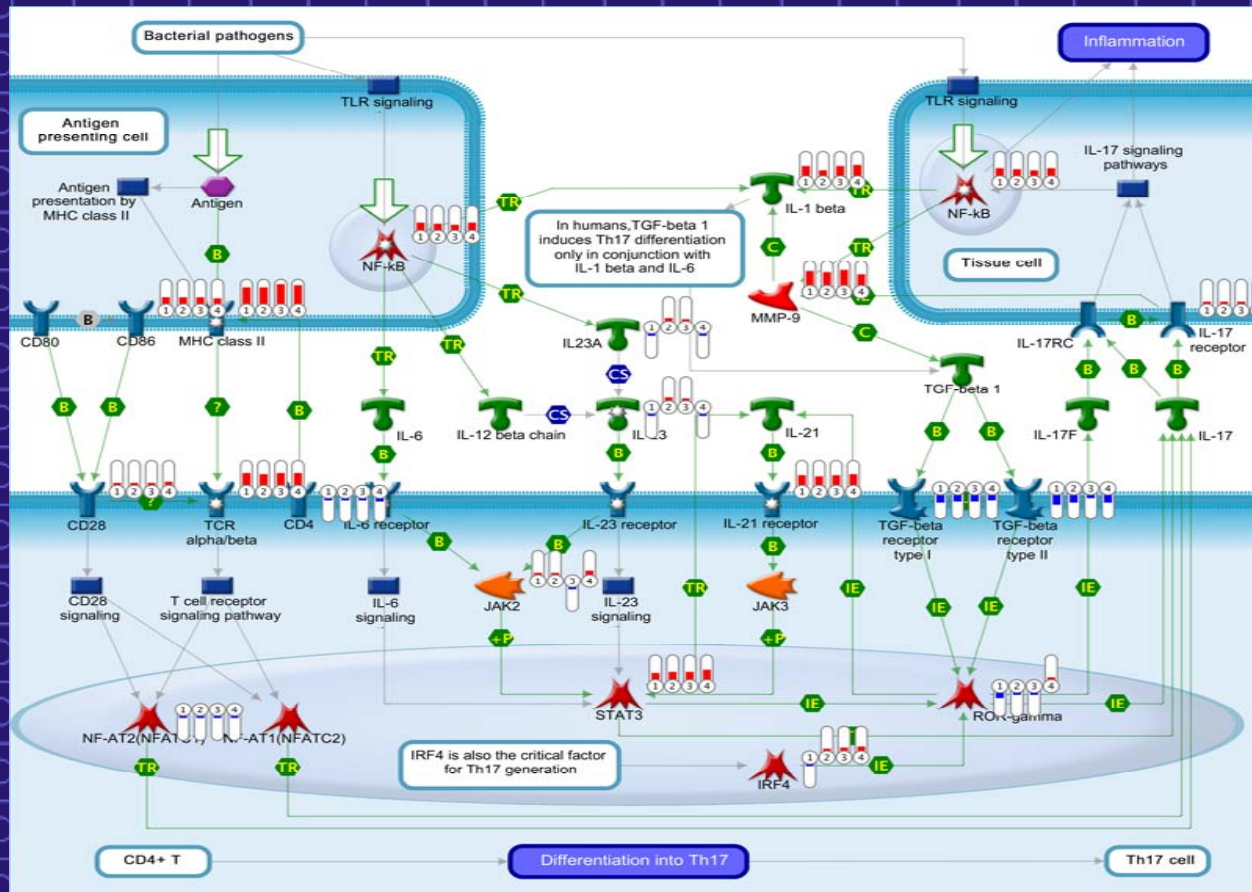
# IL-23 signální dráha

( $p=0,008937$ )



# IL-17 buněčná diferenciace

( $p=0,01143$ )



# Závěr

- Naše výsledky potvrdily, že pro vznik T1D jsou důležité i jiné imunitní mechanismy (resp. jejich odchylky) než pouze „čistá Th1 predominance“ autoreaktivních pomocných T lymfocytů
- **Faktory nespecifické imunitní odpovědi, faktory spojené s prezentací antigenů a komplexní regulací polarizace imunitních odpovědí (Th3/Th1 –Th9-Th17) mohou být použity jako nové potenciální biomarkery rozvoje T1D.**
- **Existují molekulární podskupiny T1D?**

# Poděkování

- Halbhuber Zbyněk<sup>2</sup>
- Hubáčková Miluše<sup>1</sup>
- Ulmannová Tereza<sup>1</sup>
- Štavíková Vendula<sup>1</sup>
- Koloušková Stanislava<sup>1</sup>
- Šumník Zdeněk<sup>1</sup>
- Šiftancová Jana<sup>1</sup>
- Obermannová Barbora<sup>1</sup>
- Petruželková Lenka<sup>1</sup>
- <sup>1</sup>12. lékařská fakulta  
University Karlovy,  
Fakultní nemocnice v  
Motole, Praha
- <sup>2</sup>Central European  
Biosystems, Praha

Finanční podpora: Národní projekt MZOFNM2005 a NPVII 2B06019

**PREDIA**

[www.predia.cz](http://www.predia.cz)

[www.labao.cz](http://www.labao.cz)

# Děkuji za pozornost



[www.predia.cz](http://www.predia.cz), [www.labao.cz](http://www.labao.cz)